

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

สัตว์ทดลอง

การวิจัยนี้ทำในไก่ ซึ่งใช้เป็นตัวแทนสัตว์ปีก โดยแบ่งไก่ออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่รักษากระดูก tibiotarsus ที่ตัดเพื่อทำให้หักโดยการใส่แกนกระดูก นีดยาตามภายในโพรงกระดูก

ไก่จำนวน 10 ตัว เพศผู้ อายุ 3 เดือน ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคติดต่อที่สำคัญ ปลอดการติดเชื้อ reo virus และไม่มีภาวะผิดปกติทางคลินิก

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่รักษากระดูก tibiotarsus หักโดยการใส่ แท่งเหล็กตามภายในโพรงกระดูก

ไก่จำนวน 9 ตัว เพศผู้ อายุ 3 เดือน ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคติดต่อที่สำคัญ ปลอดการติดเชื้อ reo virus และไม่มีภาวะผิดปกติทางคลินิก

ไก่ทั้งสองกลุ่มได้รับการตรวจร่างกาย และถ่ายภาพทางรังสีวิทยา ก่อนได้รับการวางยาสลบ เพื่อศัลยกรรมต่อไป

การวางยาสลบสัตว์ปีก

ไก่ทุกตัวได้รับการงดอาหารและน้ำเป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนทำศัลยกรรม นีดยา Gentamicin 1.25 มก./ตัว และ morphine 0.5 มก./กก. เข้ากล้ามเนื้อ แล้วชักนำการสลบด้วยก๊าซไอโซฟลูเรน (isoflurane) ความเข้มข้น 4% และควบคุมการสลบด้วยก๊าซไอโซฟลูเรน ความเข้มข้น 3% และก๊าซออกซิเจนอัตราการไหล 1.5 ลิตรต่อนาที ผ่านหน้ากากผสมสลบสำหรับสัตว์

การทำศัลยกรรม

ไก่กลุ่มที่ 1 รักษากระดูก tibiotarsus หักโดยการใส่แกนกระดูก นีดยาตามภายในโพรงกระดูก ยึดตามภายในกระดูก

1. จัดให้ไก่อยู่ในท่านอนตะแคงขวา (right lateral recumbency) ถอนขนตั้งแต่บริเวณต้นขาจนถึงส่วนของกระดูก metatarsus ทั้งด้านในและด้านนอกของขา เตรียมบริเวณผ่าตัดโดยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) และคลุมผ้าผ่าตัดโดยสอดส่วนปลายของขา ผ่านหน้าต่างของผ้าคลุม จากนั้นพันปลายเท้า โดยใช้ผ้ายึดปราศจากเชื้อ (รูปที่ 1)

2. ผ่าเปิดผิวหนังทางด้านใน (medial) ของกระดูก tibiotarsus โดยเปิดผิวหนังแค่ระดับปลายล่าง (distal third) ไปจนถึงเหนือข้อตาตุ่ม (รูปที่ 2)

3. ที่ด้านบนของกระดูก tibiotarsus แยกกล้ามเนื้อ fibularis longus ไปทางด้านหน้าและ medial head ของ gastrocnemius ไปทางด้านหลัง แยกกล้ามเนื้อออกจากกัน ดึงรั้ง medial head ของ gastrocnemius มาทางด้านหลังเพื่อที่จะได้เห็นกระดูก tibiotarsus ได้ชัดเจน (รูปที่ 3 ก และ 3 ข)

4. เหนียวนาให้กระดูก tibiotarsus หักโดย ใช้เลื่อยไฟฟ้าตัดกระดูกให้ขาดจากกันบริเวณ เนื้อ hock ประมาณ 3 เซนติเมตร (รูปที่ 4)

5. เตรียมแกนกระบอกฉีดยา (tuberculin syringe (Nipro[®])) โดยดึงจุกยางออก และตัด ส่วนท้าย ที่ใช้เป็นที่จับของแกนกระบอกฉีดยาออก จากนั้น ใช้ polydioxanone ขนาด 3-0 USP พันรอบปลายทางด้านบนของแกนกระบอกฉีดยา (รูปที่ 5)

6. คึงวัสดุผูกเข็บให้ตึงแล้วสอดแกนกระบอกฉีดยาที่เตรียมไว้เข้าไปในโพรงกระดูก (medullary canal) ของส่วนบน (proximal fragment) ของกระดูก tibiotarsus ที่หัก ดันตัวแกนไป จนชนกับ metaphysis ของ tibiotarsus ตัดแกนที่ยื่นออกมาโดยไม่ต้องตัดวัสดุผูกเข็บ แล้วจัดกระดูก กลับเข้าที่แล้วดึงปลายของวัสดุผูกเข็บทั้งสองปลายพร้อมกัน ลงมาตามแนวแกนของกระดูก เพื่อดึง รั้งให้ส่วนล่างของแกนกระบอกฉีดยาเข้าไปอยู่ในโพรงกระดูกชั้นล่างจนถึงส่วนของ metaphysis ของ tibiotarsus ด้านล่าง (shuttle technique) (Maccoy, 1996) (รูปที่ 6 ก, 6 ข, 6 ค)

7. ใช้แท่งเหล็กตามภายในโพรงกระดูก ขนาด 2.0 มิลลิเมตร และสว่านไฟฟ้าเจาะผ่าน เปลือกกระดูกแกนกระบอกฉีดยาและเปลือกกระดูกอีกด้าน ทั้งทางด้านบน และด้านล่างของรอยหัก ให้ห่างจากรอยหักด้านละ 1 เซนติเมตร ตัด pin ให้เหลือปลายโผล่ออกมาจากผิวกระดูกเล็กน้อย กรณีที่แท่งเหล็กไม่สามารถยึดกระดูก ได้อย่างมั่นคงใช้ลวดขนาดเหมาะสมในการรัดกระดูกและ แกนกระบอกฉีดยาในโพรงกระดูกยึดเพื่อต้านแรงหมุนแทน (รูปที่ 7)

8. เข็บกล้ามเนื้อ fibularis longus และกล้ามเนื้อ medial head ของ gastrocnemius แบบ simple continuous pattern ด้วย polydioxanone ขนาด 3-0 USP (รูปที่ 8)

9. เข็บปิดชั้นผิวหนังแบบ simple continuous suture โดยใช้ polyamide ขนาด 3-0 USP

10. ความช่วยเหลือภายนอกโดยใช้ สำลือรองเฝือกและกระบอกฉีดยาพลาสติก (รูปที่ 9)

ไก่อกลุ่มที่ 2 รักษากระดูก tibiotarsus หัก โดยการใส่ แท่งเหล็กตามภายในโพรงกระดูก

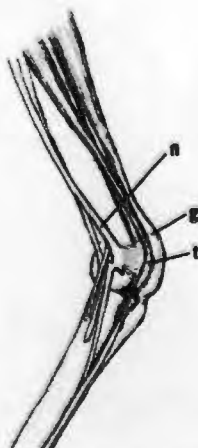
ขั้นตอนการวางยาสลบถึงขั้นตอนการผ่าตัด เพื่อตัดกระดูกเหมือนในไก่อกลุ่มที่ 1 ใช้แท่ง โลหะ ขนาด 2.5 และ pin chuck แท่ง pin แบบ normograde โดยเริ่มแท่งจาก ด้าน medial ที่ตำแหน่ง เนื้อ tibial tuberosity ค่อยๆ แท่งให้ pin เข้าไปในโพรงกระดูกจนถึงรอยหักของกระดูก จากนั้น ดึง กระดูกที่หักกลับเข้าที่ และแท่ง pin ต่อไปจนปลาย pin ฝังใน metaphysis ด้านล่างของกระดูก tibiotarsus จากนั้นเข็บปิด กล้ามเนื้อผิวหนัง และพันค้ำขา เช่นเดียวกับกับ กลุ่มที่ 1 (รูปที่ 10)



รูปที่ 1 บริเวณทำศัลยกรรมที่ได้รับการเตรียมและคลุมผ้า โดยเทคนิคปลอดเชื้อ



รูปที่ 2 กรีดเปิดผ้าผิวหนังทางด้านใน (medial approach) ของกระดูก tibiotarsus เริ่มจากบริเวณ 1/3 ของขาด้านล่าง ไปจนถึงเหนือข้อศอก



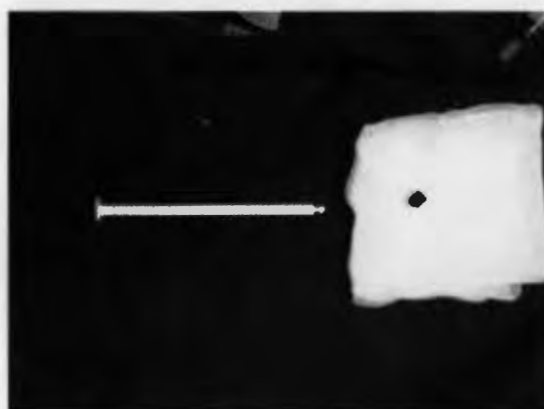
รูปที่ 3 ก ลักษณะทางกายวิภาคบริเวณกระดูก tibiotarsus (n= fibularis longus muscle, g= medial head ของ gastrocnemius) (http://people.eku.edu/ritchison/BirdBone_drawing.jpg)



รูปที่ 3 ข แยกกล้ามเนื้อที่อยู่ทางด้านหน้าและด้านหลังกระดูก tibiotarsus เพื่อให้เห็นกระดูกได้อย่างชัดเจน



รูปที่ 4 การใช้เลื่อยไฟฟ้าตัดกระดูก tibiotarsus เพื่อเหนี่ยวนำให้กระดูกหักที่ บริเวณ 1/3 ทางด้านล่างของกระดูก tibiotarsus



รูปที่ 5 แกนกระบอกฉีดยาที่ใช้ในการตามภายในโพรงกระดูกที่เหนี่ยวนำให้หัก



รูปที่ 6 ก วิธีการสอดแกนกระบอกฉีดยาเข้าไปในโพรงกระดูกของ proximal fragment



รูปที่ 6 ข การจัดกระดูกกลับเข้าที่ให้อยู่ในแนวแกนปกติตามเดิม



รูปที่ 6 ค การดึงวัสดุผูกเข็บที่ติดกับแกนกระบอกฉีดยาเพื่อให้แกนกระบอกฉีดยาเลื่อนลงมาอยู่ในโพรงกระดูก distal fragment



รูปที่ 7 การใช้ kirschner wire ทำ transfixation pin ที่ 1 เซนติเมตรเหนือและใต้รอยหักของกระดูก



รูปที่ 8 การเย็บปิดชั้นกล้ามเนื้อ



รูปที่ 9 การพันคานาช่วยพยุงภายนอก



รูปที่ 10 การใส่ แท่งเหล็กคามภายในโพรงกระดูก แบบ normograde

การดูแลภายหลังศัลยกรรม (Postoperative care)

ไก่อ่ทุกตัวได้รับ Gentamicin 1.25 มก./ตัว และ morphine 0.5 มก./กก. ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ภายหลังการทำศัลยกรรมทันที และได้รับ Gentamicin 1.25 มก./ตัว วันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน ภายหลังการทำศัลยกรรม และตัดไหมในวันที่ 14 ภายหลังทำศัลยกรรม

ตรวจการหายของกระดูกทางคลินิก โดยการคลำและการตรวจทางรังสีวิทยา และนำเอา อุปกรณ์คามภายนอกออก เมื่อพบการต่อติดของกระดูกทางคลินิก

การตรวจทางคลินิกและทางรังสีวิทยา

ถ่ายภาพรังสีวิทยาไก่อ่ทุกตัวรวมทั้งหมด 6 ครั้ง คือ ก่อนทำศัลยกรรม ภายหลังจากการทำศัลยกรรมทันที และ ที่ 4, 8, 10, 12 และ 48 สัปดาห์ภายหลังจากการทำศัลยกรรม

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

เก็บตัวอย่าง จากกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 กลุ่มละ 1 ตัวอย่าง โดยเก็บ กระดูกบริเวณที่หัก เนื้อเยื่อบริเวณรอบๆ กระดูกที่หัก ที่สัปดาห์ที่ 4, 8, 10, 12 และ 48 ภายหลังการทำศัลยกรรม

การเก็บตัวอย่าง

ขั้นตอนการวางยาสลบสัตว์ และการผ่าตัด เข้าหากระดูก ทำเหมือนกับขั้นตอนการผ่าตัด เพื่อตามกระดูก

ไก่อ่กลุ่มที่ 1: นำ transfixation pin และ orthopedics wire ออก ใช้เลื่อยไฟฟ้าตัด บริเวณที่ทำ การรักษากระดูก โดยตัดเหนือ hock 3 เซนติเมตร ให้ส่วนที่ด้องการเก็บตัวอย่างมีความหนา 0.5 เซนติเมตร จากนั้น Euthanasia สัตว์ โดยการดมสลบ

ไก่อกลุ่มที่ 2: นำแท่งเหล็กออกแล้วใช้เลื่อยไฟฟ้าตัด บริเวณที่ทำการรักษากระดูก โดยตัดเหนือ hock 3 เซนติเมตรให้ส่วนที่ต้องการเก็บตัวอย่างมีความหนา 0.5 เซนติเมตร จากนั้น Euthanasia สัตว์ เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1

การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

นำตัวอย่างที่เก็บได้ส่งตรวจทางพยาธิวิทยา โดยใช้ 10% neutral-buffered formalin ในการถนอมสภาพตัวอย่าง จากนั้นนำส่วนที่เป็นกระดูกผ่านขั้นตอน decalcification ด้วยน้ำยา formic acid-sodium citrate solution นำตัวอย่างที่ผ่าน decalcification อย่างสมบูรณ์ (ประมาณ 2 สัปดาห์) แล้วผ่านขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยา โดยฝังลงใน paraffin เพื่อทำ section ขนาด 6-8 μm และย้อมสี hematoxylin and eosin (H&E) เพื่อตรวจเนื้อเยื่อ

การประเมินผล

1. วิเคราะห์ประสิทธิภาพการใส่ขาของไก่ภายหลังทำศัลยกรรมที่ 4, 8, 10, 12 และ 48 สัปดาห์ ภายหลังการประเมินผลการทำศัลยกรรม โดยให้คะแนนระดับความเจ็บปวดและความสามารถในการใส่ขาดังนี้

ระดับ 0 ไก่อไม่แสดงอาการเจ็บเดินและวิ่งได้อย่างปกติ

ระดับ 1 ไก่อเดินได้โดยไม่แสดงอาการเจ็บ แต่จะแสดงอาการเจ็บขณะวิ่ง

ระดับ 2 ไก่อแสดงอาการเจ็บขณะเดิน และวิ่ง

ระดับ 3 ไก่อแสดงอาการเจ็บขณะเดินหรือ ไม่สามารถใส่ขาข้างที่เจ็บแตะพื้นได้ หรือวิ่งได้

การประเมินผลจากประสิทธิภาพในการใส่ขาของไก่ภายหลังจากการทำศัลยกรรม โดยเปรียบเทียบระหว่างการรักษาโดยการใส่แกนกระดูกชนิดความภายในโพรงกระดูกและการรักษาโดยใช้แท่งเหล็กยึดคานจากภายในกระดูก ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Mann-Whitney U test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

2. การประเมินผลจากภาพถ่ายทางรังสีวิทยาที่ 4, 8, 10, 12 และ 48 สัปดาห์ภายหลังจากการทำศัลยกรรม โดยดู การซ่อมแซม การเกิดการพอกของกระดูกภายในโพรงกระดูกและระหว่างปลายกระดูก แบ่งระดับคะแนนการหายของกระดูก ดังนี้

ระดับ 0 ไม่มีพบการพอกของกระดูกทั้งภายในและภายนอกโพรงกระดูก เห็นรอยหักของกระดูกชัดเจน ระยะห่างระหว่างปลายกระดูกหักเท่าเดิม (รูปที่ 11)

ระดับ 1 มีการพอกของ callus ภายในโพรงกระดูก เห็นรอยหักของกระดูกชัดเจน ระยะห่างระหว่างปลายกระดูกหักเท่าเดิม (รูปที่ 12)

ระดับ 2 มีการพอกของ callus ภายในโพรงกระดูกมากขึ้น เห็นรอยหักของกระดูกไม่ชัดเจน ระยะห่างระหว่างปลายกระดูกหักแคบลง (รูปที่ 13)

ระดับ 3 มีการพอกของ callus ภายในโพรงกระดูกและระหว่างปลายกระดูกอย่างสมบูรณ์ ไม่เห็นรอยหักของกระดูก มีการต่อติคของกระดูกที่หักอย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 14)

การประเมินผลจากภาพถ่ายทางรังสีวิทยา เพื่อการประเมินการต่อติคของกระดูก โดยการให้คะแนนการต่อติคของกระดูกขาของไก่ ภายหลังจากการทำศัลยกรรมโดยเปรียบเทียบระหว่างการรักษาโดยใช้แกนกระดูกซี่โครงภายในโพรงกระดูก และการรักษาโดยใช้แท่งเหล็กคานภายในโพรงกระดูก ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Mann-Whitney U test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

3. ผลการวิเคราะห์ ปฏิกริยาการตอบสนองของร่างกายต่อแกนกระดูกซี่โครง และ แท่งเหล็กคานภายในโพรงกระดูก ภาวะ bone lysis, sequestrum และ callus จากภาพทางรังสีวิทยาโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา

4. วิเคราะห์ปฏิกริยาการตอบสนองของร่างกายต่อ แกนกระดูกซี่โครงและการตอบสนองของร่างกายต่อ แท่งเหล็กคานภายในโพรงกระดูก ภาวะการติดเชื้อ และ sequestrum ทางจุลพยาธิวิทยา โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา